ANALYSE EINER STARK POLAREN FRAKTION IM IONENAUSTAUSCH–CHROMATOGRAMM SÄURELÖSLICHER NUCLEOTIDE DES RATTENHIRNS

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jürgen Woischwill

Saarbrücken

1972

AUS DER ABTEILUNG FÜR NEUROCHEMIE

(Vorsteher: Professor Dr.med. K. KANIG)

DER NERVENKLINIK DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG/SAAR

(Direktor: Professor Dr.med. H.-H. MEYER)

ANALYSE EINER STARK POLAREN FRAKTION IM IONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAMM SÄURELÖSLICHER NUCLEOTIDE DES RATTENHIRNS

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1972

vorgelegt von

Jürgen WOISCHWILL

geb. am 1.6.1941 in Ragnit/Ostpreußen

Dekan: Professor Dr. H. KULENKAMPFF

Referent: Professor Dr. K. KANIG

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promotionsdatum: 10.5.1972

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	3
B.	MATERIAL UND METHODIK	7
I.	Tiermaterial, Gewebegewinnung und -extraktion	7
II.	Markierung mit $^{32}P_i$	8
III.	Ionenaustausch-Chromatographie	9
	a. Säulenmaße und Mischervolumen	12
	b. Elution der Fraktion 28	13
IV.	Entsalzen der Fraktion 28	13
	a. Sublimation von Ammoniumformiat	14
	b. Adsorption der Fraktion 28 an Tierkohle	15
	c. Gelfiltration	15
	d. Ionenaustauscher-Harze	17
	1. Kationenaustauscher	17
	2. Ionenverzögererharz	19
	3. Anionenaustauscher	19
V.	Weitere Verfahren zur Identifizierung der Fraktion 28	21
	a. Papierchromatographie	21
	b. Dünnschichtchromatographie	22
	c. Elektrophorese	23
	d. Rechromatographie an Anionenaustauschern	24
	e. Bestimmung der Nucleosidbestandteile am Nucleosidanalysator	25

Seite

C. ERGEBNISSE 31

I. Ergebnisse mit der Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 1X8 31

II. Ergebnisse mit anderen chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren, wie 32

a. Papier- und Dünnschichtchromatographie 32

b. Elektrophorese 33

c. Nucleosidanalysator 35

d. Rechromatographie an DEAE Sephadex A-25 36

D. DISKUSSION 4o

E. ZUSAMMENFASSUNG 45

F. ABKÜRZUNGEN 47

G. LITERATUR 48

A. EINLEITUNG

Die freien Nucleotide bilden in der Zelle einen pool, aus dem der Bedarf für ihre Coenzymfunktionen und für den Auf- und Umbau der Nucleinsäuren gedeckt wird. Seit der Entdeckung der Inosinsäure (J.v. LIEBIG, 1847) gelang es zwar, eine Reihe einzelner Nucleotide zu isolieren, jedoch brachte erst die Einführung der Ionenaustausch-Chromatographie in dieses Gebiet (COHN, 1949, 1950) einen entscheidenden Fortschritt. Die Methode wurde durch HURLBERT u. Mitarb. (1954) systematisiert und mit der perchlorsauren Extraktion des Gewebes (KALCKAR, 1947) verbunden. Während die Coenzymeigenschafren der freien Nucleotide schon länger bekannt sind, wurde der Mechanismus für Nucleinsäuresynthesen erst später aufgeklärt.

Ein Zusammenhang von Nucleosidtriphosphaten und Desoxyribonucleinsäure (DNA) wurde durch die Untersuchungen von KORNBERG u. Mitarb. (1958) bewiesen, denen mit einer primer-DNA, Mg^{++} - Ionen und Desoxyribonucleosidtriphosphaten die erste DNA-Synthese in vitro mit einer von E. coli gewonnenen und 2.000-fach gereinigten DNA-Polymerase gelang. Am GTP-pool untersuchten SALSER u. Mitarb. (1968) den Einbau ^{14}C-markierten Guanins in mRNA, das Wiederauffüllen des pools aus

unstabiler RNA und die Rate der GTP-de-novo-Synthese über IMP.

Neben den pool-Eigenschaften der Triphosphate interessierten deren Cofaktorfunktionen im Nucleinsäurestoffwechsel. So weiß man seit den Untersuchungen HOAGLANDs u. Mitarb. (1958), daß GTP am Initiationsvorgang der Proteinsynthese beteiligt ist. REVEL u. Mitarb. (197o) berichteten kürzlich über die GTP-abhängige Bindung von N-Formyl-Methionyl-t-RNA an die 30 S-Ribosomenuntereinheit, die außerdem den Initiationsfaktor F_2 und eine GTPase benötigte.

Die funktionelle Bedeutung der freien Nucleotide erklärt das Interesse an einer Fraktion (KANIG, 1965), die polarer als die Ribonucleosid-triphosphate ist und daher im Ionenaustausch-Chromatogramm säurelöslicher Rattenhirnnucleotide als letzte auftritt (Abb. 1). Es gelang zwar, Guanosin in dieser Fraktion nachzuweisen, jedoch spricht die Verschiebung des Quotienten $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ von o,7 nach o,8 im Verlauf der Elution dafür, daß es sich um mehr als eine Substanz handelt. Zusätzliches Interesse gewann die Fraktion durch ihre großen Konzentrationsunterschiede in der postnatalen Entwicklung des Rattengehirns. So ist die erwähnte Fraktion bei 2 1/2 Tage alten Ratten bezogen auf das Trockengewicht 3 1/2-fach höher vertreten als bei 24 Tage alten Tieren (Abb. 2).

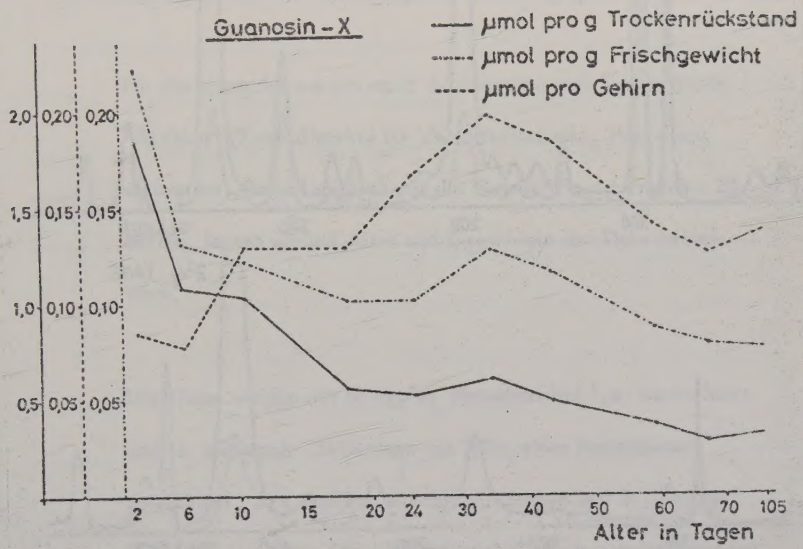


Abb. 1: Konzentration der untersuchten Fraktion aus Rattengehirnen im Verlauf der Entwicklung vom Neugeborenen- bis zum Erwachsenenalter (nach KANIG, 1965).

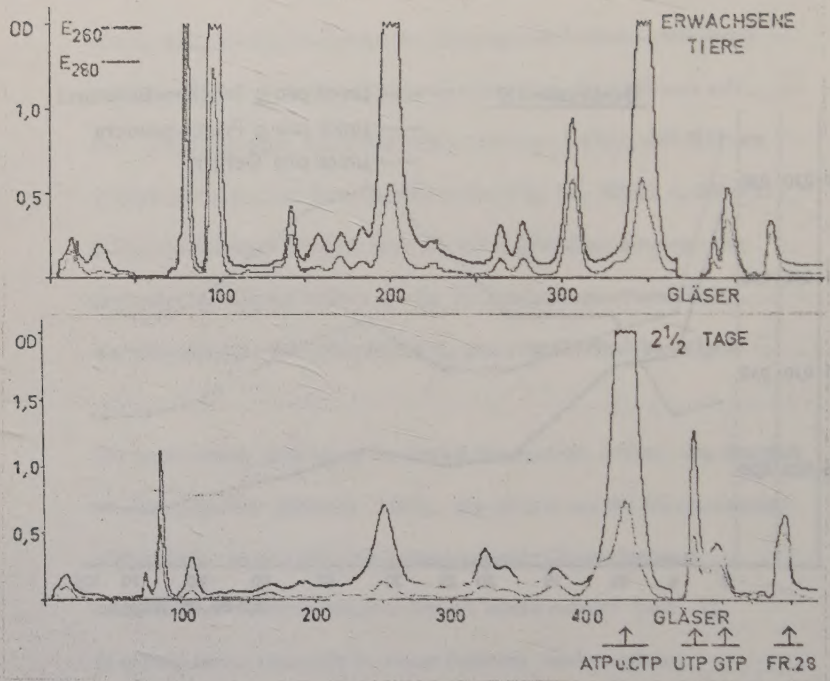


Abb. 2: Vergleich der Nucleotidauftrennung von Gehirnen 2 1/2 Tage alter Ratten mit der erwachsener Tiere (nach KANIG, 1965).

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, die Bestandteile dieser hochpoloren Fraktion zu analysieren. Gleichzeitig soll ein Versuch gemacht werden, aus der Kenntnis ihrer Bestandteile Rückschlüsse auf die postnatalen Konzentrationsdifferenzen abzuleiten.

B. MATERIAL UND METHODIK

1. Tiermaterial, Gewebegewinnung und -extraktion.

Für die Versuche wurden meist Albinoratten vom Stamm Wistar "AF/Han" (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) verwendet. Da es lediglich auf die Gewinnung der Fraktion 28 ankam, legten wir auf Alter und Geschlecht der Tiere keinen Wert.

Die Tiere wurden mit 5o mg/kg Phenobarbital i.p. narkotisiert und 1o min nach Seitenlage mit Hilfe eines Hebelmessers dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und in flüssigen Stickstoff geworfen. Die eingefrorenen Gehirne wurden gewogen (Frischgewicht= FG), in einem vorgekühlten Mörser zerkleinert und in gekühlte o,5 n Perchlorsäure gegeben (5 ml/Gehirn). Dann wurde im Ultra-Turrax homogenisiert und 45 min bei 0 bis -3° C und 2o.ooo g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 0° C mit 5 n KOH bis pH 7 - 8 neutralisiert, das ausgefallene Kaliumperchlorat abzentrifugiert. Der neutralisierte Extrakt wurde auf die Ionenaustauschersäule aufgetragen.

II. Markierung mit $^{32}P_i$.

In mehreren Versuchen wurde mit 100 μ Ci $^{32}P_i$ pro Rattengehirn nach der Methode von OESTERLE u. Mitarb. (1970) in vitro inkubiert. Isotonisches $Na_3{}^{32}PO_4$ (Hoechst AG, Frankfurt/M.) wurde durch ein Bohrloch in der Kalotte in den rechten Lobus temporalis injiziert. Die Tiere zeigten 5 min nach der Injektion und während der restlichen Inkubationszeit normales Verhalten. Nach Inkubationszeiten von 2 bis 9 Stunden wurden die Tiere in der üblichen Weise dekapitiert und ihre Gehirne weiter behandelt.

Durch die Markierung wurde die spezifische Aktivität der untersuchten Fraktion als Differenzierungsmerkmal gewonnen. Im Vergleich zu den übrigen markierten Nucleotiden wurde eine Schätzung der Stoffwechselaktivität möglich. Bei Rechromatographien zur Identifizierung wurde das Wiederauffinden und die Unterscheidung von anderen UV-absorbierenden Substanzen erleichtert.

III. Ionenaustausch-Chromatographie.

Zur Auftrennung der Nucleotide des Rattengehirns benutzten wir das von KANIG und KORANSKY (1961) sowie von KANIG (1963) verbesserte Verfahren der Ionenaustausch-Chromatographie nach HURLBERT u. Mitarb. (1954). Mit dieser Methode gelang inzwischen eine Auftrennung in 28 Fraktionen (KANIG u. OESTERLE, 1972; Abb. 3). Als Anionen-Austauscher wird Dowex 1X8 Formiat-Form benutzt. Da das Verfahren mehrfach ausführlich dargestellt wurde (BRÜSTLE, 1969; LEHBERGER, 1971), sollen nur die für die vorliegende Arbeit vorgenommenen Änderungen beschrieben werden.

Abb. 3 s. S. 10.

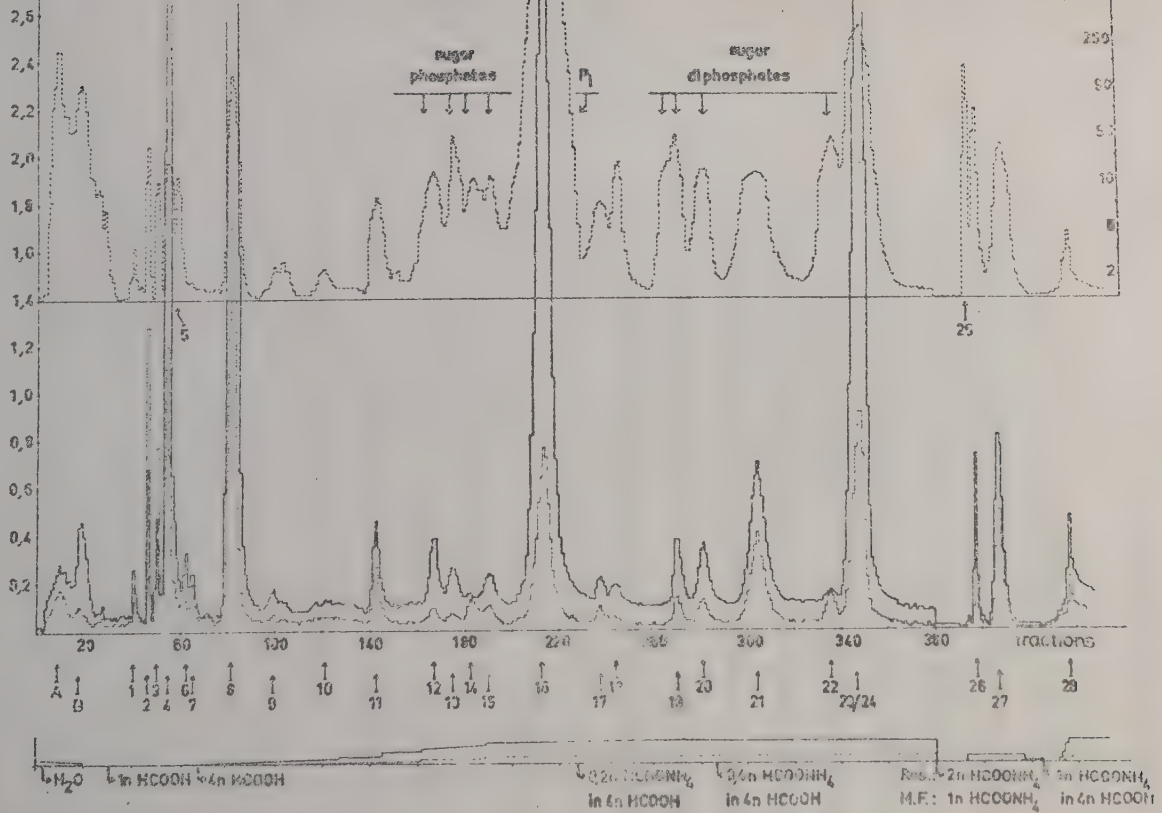


Abb.3: Legende s. S. 11.

Legende zu Abb. 3:

Ionenaustausch-Chromatogramm eines Extraktes aus 1o Rattengehirnen.

Obere Kurve: Radioaktivität.

Untere Kurve: UV-Extinktion bei _____ 260 nm und ..... 280 nm.

A, B: Basen, basische Phosphorsäurederivate, Nicotinamid;

1: CMP; 2: CDP-Cholin; 3: CDP-Äthanolamin; 4: NAD;

5: N-Phosphorylkreatin; 6: Uridin; 7: Harnsäure; 8: AMP;

9: 3′,5′-AMP; 1o: NADP; 11: GMP; 12: ADP-Ribose; 13: IMP;

14: CDP; 15: UMP; 16: ADP; 17: UDPx (-Galaktose ?); 18: FAD;

19: UDP-N-Acetylglucosamin; 2o: UDP-Glucose; 21: GDP; 22: CTP;

23: UDP; 24: ATP; 25: 2′,3′-Diphosphoglycerinsäure; 26: UTP;

27: GTP; 28: Oligonucleotide. (Aus KÄNIG u. OESTERLE, 1972).

a. Säulenmaße und Mischervolumen.

Wegen der geringeren Konzentration der gesuchten Substanzen war es nötig, Hirnextrakte von einer größeren Anzahl von Tieren aufzutrennen. Um identische Chromatogramme auch bei größeren und voneinander differierenden Extraktmengen zu gewinnen, mußte ein entsprechendes System entwickelt werden. Dabei konnten wir von KANIGs (1963) Untersuchungen ausgehen, wonach eine Verlängerung der Säule über 40 cm keine verbesserte Auftrennung mehr ergibt.

Berücksichtigt man die Größen

Höhe $h = 40$ cm ($=$ Konst.) und

Gesamttrockengewicht FG der Rattengehirne, so errechnet sich der Säulenradius r nach der Formel

$$r = 0{,}05 \sqrt{5 \times FG}$$

Um den Gradienten des Lösungsmittels dem vergrößerten System anzupassen, erwarteten wir, daß wir das Mischervolumen dementsprechend neu berechnen müßten. Jedoch zeigte es sich, daß das Grundschema nur durch die Verwendung eines Mischers von 1.000 ml zwischen den Fraktionen 16 und 25 geändert werden mußte, um vergleichbare Chromatogramme zu erhalten.

b. Elution der Fraktion 28.

Nach saurer und gepufferter Gradientenelution ist der Schritt zur Gewinnung der gesuchten Fraktion 28 eine Stufenelution mit 1 n NH_4HCOO in 4 n HCOOH. Da der starke Salzgehalt nachfolgende Schritte zur Identifizierung erschwert, wurden einzelne Versuche im letzten Abschnitt durch eine Elution mit 6 n HCOOH oder einem Salzsäuregradienten von 3 n HCl über einen 1.000 ml-Mischer abgeschlossen. (Zuvor wurden freies Ammoniumformiat und freie Ameisensäure mit Wasser aus der Säule gewaschen). Hierdurch gelingt es, die Fraktion salzfrei zu gewinnen. Die verwendeten Säuren konnten durch Gefriertrocknung entfernt werden. Da die Elutionen pH-Werte unter 1 hatten, und die Identität der eluierten Substanzen durch die Änderung des Systems nicht gesichert war, wurde dieses Verfahren wieder verlassen. Bei Anwendung von 6 n Ameisensäure wurde zudem nur ein Drittel der Substanz eluiert.

IV. Entsalzen der Fraktion 28.

Da die Fraktion 28 bei dem üblichen Chromatographieschema durch das Lösungsmittel 1 n NH_4COOH in 4 n HCOOH eluiert wird, entfallen je nach Extraktmenge ca. 3 OD auf 1o g Ammoniumformiat. Ein Problem der vorliegenden Arbeit bildete daher die Aufgabe, die gesuchte Substanz

für nachfolgende Identifizierungsschritte salzfrei zu erhalten. Folgende Bedingungen mußten an das Entsalzungsverfahren gestellt werden:

1. Wegen der geringen Substanzmengen mußte es weitgehend verlustfrei arbeiten.

2. Es sollte einfach in der Vorbereitung und komplikationslos in der Anwendung sein.

3. Wegen der Gefahr der Abspaltung von Gruppen oder sonstigen Alterierung mußte ein zeitraubendes Verfahren vermieden werden, insbesondere bei niedrigen pH-Werten und in der Wärme.

a. Sublimation von Ammoniumformiat.

Nach Beseitigung der Ameisensäure durch Gefriertrocknung kann Ammoniumformiat durch Sublimation am Vakuum entfernt werden. Nach 12 h Sublimation bei Raumtemperatur am Vakuum von 10^{-3} Torr hatte der stark hygroskopische Salzrückstand immer noch einen pH-Wert von 3,9. Zwar gelingt es, durch gleichzeitiges Erwärmen die Sublimation zu beschleunigen, jedoch bilden sich durch den geringen Gehalt von Erdalkali- und Schwermetallionen im Eluens in der Wärme Metallsalz-Nukleotid-

Komplexe (WEITZEL und SPEHRM, 1958), die schwer löslich sind und eine Auftrennung durch anschließende Chromatographieverfahren behindern.

b. Adsorption der Fraktion 28 an Tierkohle.

Auf dem Nucleotid-Nucleinsäurengebiet wurde Tierkohle früher häufig zum Entsalzen angewandt (CRANE und LIPMANN, 1953; TSUBOI und PRICE, 1959). Die Kohle wird mit toluolgesättigter konzentrierter Salzsäure aktiviert. Das Nucleotidmaterial adsorbiert man bei pH 3. Durch Nachwaschen mit Wasser werden die Salze entfernt. Anschließend eluiert man die Nucleotide mit o,3 prozentigem Ammoniak in 5o-prozentigem Äthanol. Bei unseren Versuchen mit Tierkohle stellten wir fest, daß nach sehr gründlichem Vorwaschen immer noch UV-absorbierende Substanzen in der Waschflüssigkeit auftraten. Darüber hinaus wurde der Durchfluß mit steigendem Druck immer geringer, wenn man eine Schlauchpumpe an die Säule anschloß.

c. Gelfiltration.

Zur Gelfiltration werden häufig Dextrane (Sephadex G-1o, - G-2oo, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und Polyacrylamide (Bio-Gel P-2 - P-3oo, BIO-RAD Laboratories, München) benutzt. Bei der Filtration wandern Moleküle oberhalb der Ausschlußgrenze in der Lösungsmittelphase. Kleinere Moleküle treten zunächst in die

Gelpartikel ein und wandern dadurch langsamer.

Auf dem Nucleinsäuregebiet wird diese Methode zur Fraktionierung und zum Entsalzen herangezogen. Nach Arbeiten von UZIEL und COHN (1965) und UZIEL (1967) ist Entsalzung von Mononucleotiden mit Gelen vom höchsten Vernetzungsgrad möglich. Wir führten daher Versuche mit Sephadex G-10 und Bio-Gel P-2, 100 - 200 mesh, durch.

Mit Bio-Gel P-2 wurden 14 Entsalzungsversuche vorgenommen. Dabei wurden Säulen von 60 cm Länge verwendet. Die Durchmesser wurden von 1 cm bis 1,8 cm variiert. Ebenfalls wurden verschiedene Durchflußraten von 0,5 bis 3 ml/cm^2 / min wechselnd benutzt. Die Anweisungen von UZIEL wurden peinlich genau beachtet. Es wurden daher als Lösungsmittel 5-prozentiges Äthanol mit Ammoniak auf pH 9 eingestellt. Die Auftragsvolumina betrugen 2 - 10 % des Säulenvolumens. Mit Sephadex G-10 wurden Versuche an Säulen von 1,3 x 145 cm durchgeführt. Lösungsmittel war 5-prozentiges n-Butanol, das mit Ammoniak auf pH 9 eingestellt wurde.

Da aus unserer Fraktion 28 Ammoniumformiat zu entfernen war, wurde dessen Verteilung im Eluat mit Nessler's Reagens nach der Farbintensität bestimmt, indem aus den Einzelfraktionen von 2,5 ml jeweils 0,1 ml ent-

nommen wurde. Die Verteilung der Nucleotide wurde direkt als E_{260} photometrisch gemessen.

Nach UZIEL war ein Überlappen des Salz- und des Nucleotidgipfels zu erwarten. Bei unseren Versuchen deckten sich jedoch Salz- und Nucleotidgipfel vollständig, so daß selbst durch mehrfaches Passieren der Säule ein Entsalzen nicht möglich war. Ebensowenig gelang es, die Nucleotide an sauer equilibrierte Säulen zu adsorbieren und dann durch Nachwaschen und erneute Elution salzfrei zu gewinnen.

d. Ionenaustauscher-Harze.

Ionenaustauscher werden zur Entsalzung niedermolekularer Substanzen häufig verwendet (RUSHIZKY und SOBER, 1962; COHN und BOLLUM, 1962). Hierbei können Anionen- und Kationenaustauscher verwendet werden.

1. Kationenaustauscher.

Der Kationenaustauscher wird durch Waschen mit o,5 n HCl mit Protonen beladen. Wenn man anschließend eine Ammoniumformiat-Nucleotidlösung auf die Austauschersäule gibt, wird das NH_4^+-Ion im Wechsel gegen das Proton gebunden; die negativ geladenen Nucleotide passieren die Säule. Unter der freiwerdenden Ameisensäure ändert sich jedoch der Quellungszustand des Harzes, wobei

Nucleotidmaterial eingeschlossen werden kann ("trapping effect"). Um die Nucleotide möglichst vollständig wiederzugewinnen, muß die Säule mit Wasser (5-fachem Säulenvolumen) nachgewaschen werden.

Wir verwendeten die stark sauren Kationenaustauscher Amberlite IR 120 und Dowex 50 WX4, 100 - 200 mesh. Mit Amberlite IR 120 wurde ein Vorversuch mit ^{32}P-markiertem GTP in 44 ml einer 1,5 n Ammoniumformiatlösung an einer Säule von 200 ml Gesamtvolumen durchgeführt. Dabei ergab sich nach der Aktivitätsmessung ein Substanzverlust von 25,7 %, während die UV-Extinktion um 4,9 % zugenommen hatte. An Dowex 50 WX4, 100 - 200 mesh wurden Proben entsalzen, bei denen die Salzmengen durch Sublimation stark vermindert waren. Sehr geringe Salzmengen wurden durch Passieren von austauschergefüllten Einmalspritzen entsalzen, in denen der Ausfluß durch ein Rundfilter aus Glasfaserpapier (Selecta, Schleicher und Schüll) abgedeckt war. Eingeengt wurden die Proben bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer (BÜCHI) über eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte Falle.

2. Ionenverzögererharz.

Das Ionenverzögererharz AG 11 A 8 (BIO-RAD Laboratories, München) enthält neben den stark basischen quarternären Ammoniumgruppen des Dowex 1 schwach saure Carboxylgruppen durch Polymerisation mit Acrylsäure. Benutzt man Wasser als Lösungsmittel, so werden im Auftrag enthaltene Salzionen und -Kationen gegenüber größeren organischen Molekülen verzögert. Bei Vorversuchen mit 500 µg UTP in 10 ml 5 n Ammoniumformiat an einer 1 x 100 cm-Säule wurde nur 1/6 der Substanz vom Salz befreit. Eine Verlängerung der Säule auf 140 cm brachte nur eine Verbreiterung der Bande, so daß es schwierig wurde, die Elution des Gipfels mit UV-Zelle und Schreibersystem (LKB-Produkter, Schweden) zu überwachen. Da das Auftragvolumen 1/10 des Säulenvolumens betragen und das abzutrennende Salz nicht höher als 4 n sein soll, hätten 2 - 3 OD der gesuchten Substanz in 100 ml Auftragsvolumen an einer 1.000 ml Säule aufgetrennt werden müssen. Das Verfahren schien deshalb für unsere Fragestellung nicht geeignet.

3. Anionenaustauscher.

Am besten eignen sich Anionenaustauscher, bei denen man die Elutionsmittel nach der Chromatographie leicht entfernen kann. Diese Bedingung erfüllt DEAE-Sephadex A-25, wenn man ihn in der

HCO_3^- - Form benutzt. Triäthylammoniumhydrogencarbonat wird als Eluens verwendet, weil es leicht in seine flüchtigen Bestandteile zerfällt. Wir adsorbierten unsere Probe stark verdünnt als o,o25 n Ammoniumformiatlösung bei pH 9 an eine Sephadex A-25-Säule 1,o x 13,o cm. Die Nucleotide werden bei diesem pH als starke Anionen gebunden. Adsorbierte Formiationen entfernten wir durch ein Nachwaschen mit dem hundertfachen Säulenvolumen einer o,oo5 n Triäthylammoniumbicarbonat-Lösung. Anschließend eluierten wir die Nucleotide mit 5 ml einer 1 n Triäthylammoniumhydrogencarbonat-Lösung. Nach mehrfachem Eindampfen und Wiederaufnehmen mit 50 prozentigem Methanol am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur war das Triäthylammoniumhydrogencarbonat entfernt. Dies wurde das von uns schließlich bevorzugte Verfahren.

Ausfluß mit einer Lage Watte verstopft war. Preßt man Wasser durch die Spritze, so gelingt es, das Eluat frei von Zellulosestaub zu erhalten, der an der Papieroberfläche haftet. Langgestreckte Substanzflecken wurden mit Wasser absteigend chromatographiert, bis sich die Substanz in der herabhängenden Papierspitze angereichert hatte. Die Spitze wurde abgeschnitten und in ein o,4 ml BECKMAN-Mikroteströhrchen (Katalog-Nr. 314 326 B) fest eingepreßt. Die Röhrchenspitze wurde abgeschnitten und das Rö[illegible] einem zweiten aufgesteckt. Mit zweimal 10[illegible] Wasser wurde die Papierspitze eluiert, wobei das Eluat durch Zentrifugieren je 5 Minuten bei 3000 U/min in unteren Röhrchen aufgefangen wurde. Die UV-Spektren wurden mit einem ZEISS PMQ II aufgenommen.

b. Dünnschichtchromatographie.

Gegenüber der Papierchromatographie bietet die Dünnschichtchromatographie (STAHL, 1962) ein besseres Auflösungsvermögen und zehnmal geringeren Zeitaufwand. Wir chromatographierten an Zelluloseplatten ohne Gipszusatz mit Fluoreszenzindikator (MN 300, DFO)

---

*) Das beschriebene Elutionsverfahren, sowie die Methode der Entsalzung mit austauschergefüllten Einmalspritzen verdanke ich Herrn Dr.H.G.Gassen, MPI für Exper.Medizin, Göttingen.

in der Sättigungskammer und im Sandwichverfahren. Die Substanzflecken wurden mit der UV-Lampe und bei ^{32}P-markierten Substanzen mit dem Dünnschichtscanner (Berthold/Frieseke, Karlsruhe) lokalisiert. Nach Vorversuchen mit Testsubstanzen (SERVA) wählten wir folgende Lösungsmittel:

1) Isobuttersäure	: 25 proz. Ammoniak	: Wasser
57	: 4	: 39

2) gesätt. Ammoniumsulfatlsg.:	1 n Natriumcitrat	: Isopropanol
80	: 18	: 2

(nach MARKHAM und SMITH, 1951).

3) n-Butanol	: Methanol	: Wasser	: Aceton	: Eisessig	: 5 proz. Ammoniak
7	: 7	: 6	: 5	: 3	: 4

(nach OESTERLE, 1966).

c. Elektrophorese.

Zwei Elektrophoreseverfahren standen zur Verfügung: Dünnschichtelektrophorese (GASSEN, 1969) und Papierhochspannungselektrophorese (RIBEIRO, MITIDIERI und AFFONSO, 1961). Da wegen der großen Salzmengen die Entsalzung der Fraktion oft nicht vollständig gelang, wurde nach einigen Vorversuchen die weniger empfindliche Papierelektrophorese gewählt.

Die verwendete Apparatur ähnelte dem von WIELAND und PFLEIDERER (1955) beschriebenen Gerät. Die Kühlanlage des Trägertisches wurde bei uns durch ein wassergekühltes Labyrinth ersetzt. Als Puffer wurde o,1 n Triäthylammoniumhydrogencarbonat von pH 7,5 und o,o2 n Ammoniumformiat von pH 2,5 verwendet. Die Trennzeit betrug immer eine Stunde. Bei einer angelegten Spannung von 2000 V flossen Ströme von 3o-5o mA.

d. Rechromatographie an Anionenaustauschern.

Um zu Mononucleotiden zu gelangen, wurde die Fraktion nach zwölfstündiger Hydrolyse mit o,5 n KOH bei 4o° C an einer o,35 x 3o cm Säule DOWEX 1 x 8 (Chlorid-Form), 1oo-2oo mesh, aufgetrennt. Die Methode ergab keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Einzelgipfel enthielten immer noch Mischspektren.

Es wurde daher ein Versuch mit Sephadex A-25 durchgeführt. 24 OD wurden auf eine o,6 x 15 cm Säule aufgetragen und mit einem Triäthylammoniumhydrogencarbonat-Gradienten aufgetrennt. Die Gipfel wurden entsalzen und nach Fermentspaltung am Nucleosidanalysator (s. nächstes Kapitel) untersucht.

e. Bestimmung der Nucleosidbestandteile am Nucleosidanalysator.

Der Nucleosidanalysator stand uns in der von GASSEN und LEIFER (1970) beschriebenen Form zur Verfügung. Er stellt eine Verbesserung des von UZIEL u.Mitarb. entwickelten Apparates dar.

Der Analysator (Abb. 4) besteht aus drei Hauptelementen: Kationenaustauschersäule, Spektrophotometer und Schreibersystem. Bei einem definierten Puffersystem werden negativ geladene Probenbestandteile nicht adsorbiert und erscheinen im Durchbruch. Nucleoside werden ihrer Ladungsdifferenz entsprechend unterschiedlich retardiert und erscheinen nach definierten Elutionsvolumina. Die Identifizierung erfolgt nach dem Elutionsvolumen (das mit der Schreibergeschwindigkeit korreliert) und nach dem Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm (Abb. 5).

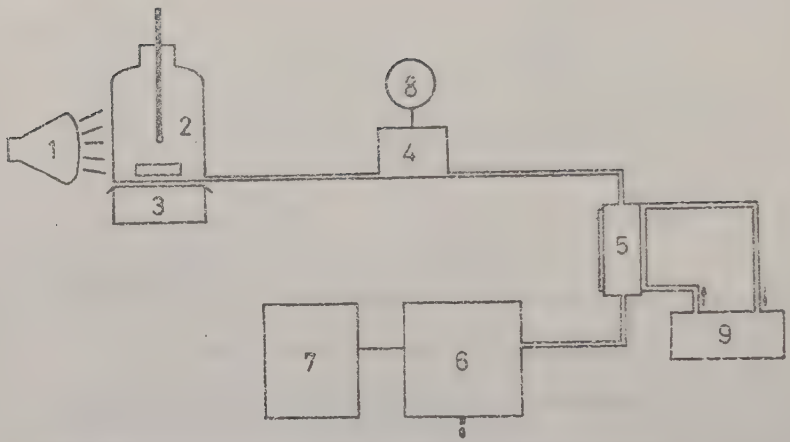


Abb. 4: Schematische Zeichnung des Nucleosidanalysators;
1 Heizlampe,
2 Puffergefäß,
3 Rührmotor,
4 Pumpe "Beckman Accuflo",
5 Austauschersäule,
6 Spektrophotometer "Beckman DB G",
7 Schreiber "Withof Transocomp 288",
8 Manometer,
9 Umwälzthermostat
(aus GASSEN u. LEIFER, 1970).

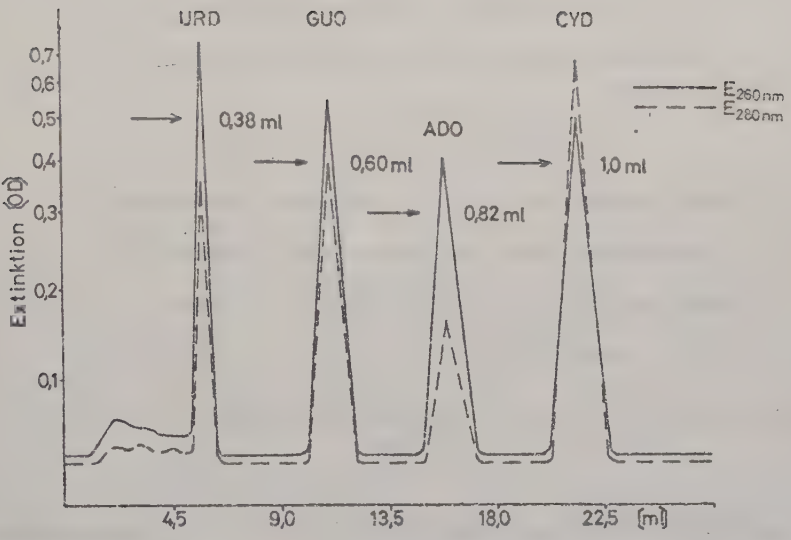


Abb. 5: Testanalyse zur Überprüfung der Ausbeute, der Position und des 280/260-Verhältnisses der 4 Nucleoside.
Säule: 22 x 0,6 cm;
Harz: Aminex A 6;
Puffer: 0,4 M $HCOONH_4$ / 0,04 M HCOOH, pH 4,65;
Fließgeschwindigkeit: 0,30 ml x min^{-1}.
Bei den Pfeilen wird die Peak-Halbwertsbreite angegeben (aus GASSEN u. LEIFER, 1970).
URD = Uridin;
GUO = Guanosin;
ADO = Adenosin;
Cyd = Cytidin.

Bei der quantitativen Auswertung (ANDERSON, 1962) werden die Peaks als gleichschenklige Dreiecke aufgefaßt. Die Fläche berechnet sich aus der Halbwertsbreite W und der Gipfelhöhe H.

$$F = W \cdot H$$

Da der Peak sich als Gaußsche Kurve darstellt, wird die Differenz zur Dreiecksfläche durch einen Korrekturfaktor C ausgeglichen. Die Gesamtextinktion berechnet sich daher nach der Formel (UZIEL u. Mitarb., 1968):

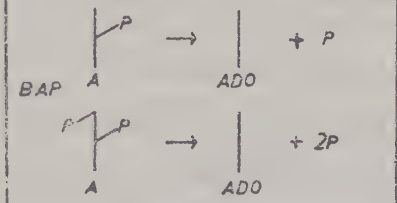
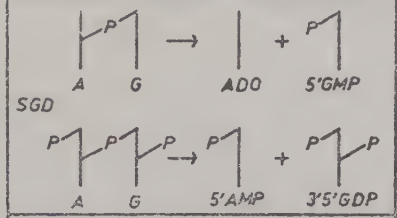
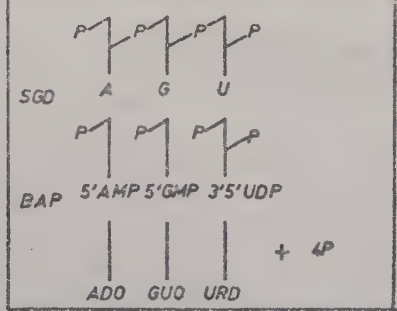
$$E_W \cdot V = H_E \cdot W_{min} \quad C \cdot {}^{ml}/_{min}$$

Die Substanzmenge in umol ergibt die Formel

$$\mu mol = \frac{H_E \cdot W_{min} \cdot C}{\varepsilon} \cdot {}^{ml}/_{min}$$

$$\varepsilon = (\text{mikromolarer Extinktionskoeffizient}) = \frac{OD}{\mu mol}$$

Vor der quantitativen Bestimmung der Nucleosidanteile mußten die Mono- und Diphosphatesterbindungen gespalten werden. Wir verwendeten hierzu Schlangengiftdiesterase (SGD, EC 3.1.41) und bakterielle alkalische Phosphatase (BAP, EC 3.1.3.1) (Fa. Worthington Biochem.Corp.). Wir hydrolysierten in 0,3 ml Mikroteströhrchen (Beckman, Kat.Nr. 314 326 B). Das Probevolumen betrug 10 µl, das Gesamtvolumen überschritt 50 µl nicht (Tab. 1).

ENZYMATISCHE HYDROLYSE	REAGENTIEN	ZEIT (min)	TEMP (0°C)
	10 µl 1 M NH_4OAc pH 8.8 5 µl Phosphatase (1 mg/ml)	160	37
	10 µl 1M Na OAc pH 6.5 5 µl SGD	30	37
	10 µl 1 M NH_4OAc pH 8.8 5 µl Phosphatase 5 µl SGD	180	45

Tab. 1: Enzymatische Spaltung von Diesterbindungen mit Schlangengift-diesterase (SGD) und Monoesterbindungen mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) zur Gewinnung der Riboside.

A = Adenin;
P = Phosphat;
ADO = Adenosin;
OAc = Acetat;
G = Guanin;
U = Uracil;
GUO = Guanosin;
URD = Uridin.

Es wurde die Nucleosidzusammensetzung der Gesamtfraktion 28 durch gleichzeitige Anwendung von SGD und BAP bestimmt. Darüber hinaus untersuchten wir die Zusammensetzung von Substanzflecken nach Elektrophorese und von Peaks aus Anionenaustausch-Chromatogrammen an DEAE-Sephadex A-25.

C. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse mit der Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 1X8.

Bereits bei der Verwendung der Stufenelution mit 1 n NH_4HCOO in 4 n HCOOH als Lösungsmittel war früheren Untersuchern (KANIG u. KORANSKY, 1961) eine inkonstante Auftrennung der Fraktion 28 in zwei Gipfel aufgefallen. Beim Umsetzen auf das Salzsäuregradientensystem gelang uns nun eine inkonstante Auftrennung der Fraktion in drei Gipfel.

Die UV-Spektren ergaben keinen Hinweis für das Auftreten nur einer Nucleobase. Auch die Untersuchungen der einzelnen Gipfel ergaben Mischspektren (Abb. 6) aus verschiedenen Nucleobasenanteilen.

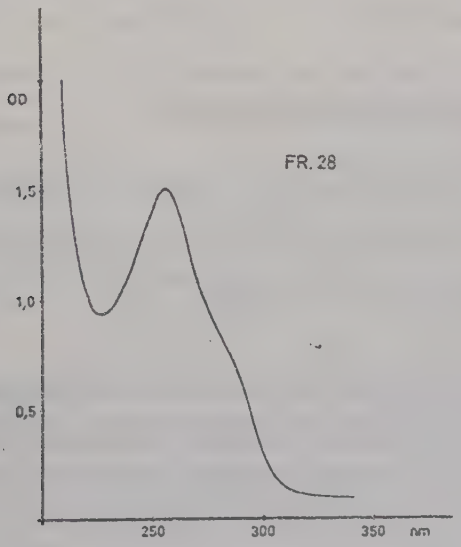


Abb. 6: Nucleotidmischspektrum aus einem Gipfel der Fraktion 28.

Die Quotienten von E_{280} / E_{260} wechselten zwischen 0,55 und 0,75. Die gewonnenen Gesamtextinktionen der Fraktion 28 lagen zwischen 16,9 % und 40,9 % der Extinktion des GTP (s. Abb. 3). Auch bei Markierung mit $Na_3{}^{32}PO_4$ ließ sich eine Beziehung zwischen der Aktivität von GTP und von Fraktion 28 nicht nachweisen.

Insgesamt deuteten diese Ergebnisse bereits darauf hin, daß die Fraktion 28 in ihrem Gehalt wechselnd und in ihrer Zusammensetzung uneinheitlich ist.

II. Ergebnisse mit anderen chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren, wie

a. Papier- und Dünnschichtchromatographie.

Die von uns eindimensional verwandten Auftrennungsverfahren an Papier und Dünnschicht waren zum vollständigen Erfassen aller Bestandteile der Fraktion ungeeignet.

Darüber hinaus wurden die Chromatogramme durch geringe Restsalzspuren empfindlich gestört, so daß die Abgrenzung einzelner Substanz-

flecken oft nicht möglich war, weil sie einen schlierigen Lauf und starkes "tailing" aufwiesen.

Im Papierchromatogramm konnten wir fluoreszierende Substanzflecken in der Zone der Mononucleotide und Riboside nachweisen. Fluoreszierende Thionucleotide sind als "atypische Basen" seit den Untersuchungen von LIPSETT (1965) sowie CARBON u. Mitarb. (1965) bekannt; sie spielen als Bestandteile der tRNA eine Rolle.

Die Dünnschichtchromatographie ergab bei Proben unterschiedlicher Versuche keine vergleichbaren Resultate. In einigen Fällen konnte dies auf Salzverunreinigungen zurückgeführt werden, da die Dünnschichtchromatographie störanfälliger ist als die Papierchromatographie. Reproduzierbare R_F-Werte fehlten jedoch auch bei scharf begrenzten Substanzflecken. Mit dem Fließmittel I gelang die Auftrennung in drei Banden. Hier wie auch bei der Ionenaustausch-Chromatographie konnten aus den eluierten Substanzflecken nur die Mischspektren vermutlich mehrerer Nucleobasenanteile gewonnen werden.

b. Elektrophorese.

Bei Anwendung der Papierelektrophorese verhielt sich die Fraktion 28 polarer als GTP. Es zeigte sich jedoch auch bei dieser Art der Auftrennung

sowie anschließender enzymatischer Spaltung und Untersuchung am Nucleosidanalysator eine starke Empfindlichkeit für Restsalzspuren. Es gelang aber der Nachweis, daß die untersuchte Fraktion neben den vier Hauptribonucleosiden (ADO, URD, Cyd, GUO) seltene Basen enthält. In den auffällig hohen Durchbruchpeaks auch der späteren Analysen vermuteten wir neben Anteilen ungespaltener Nucleotide negativ geladene Thionucleoside. Eine Auftrennung der gesammelten und entsalzenen Durchbrüche mit der Papierelektrophorese (Puffer: o,o2 n NH_4HCOOH, pH 2,5) ergab neben drei UV-absorbierenden Substanzflecken zwei fluoreszierende Flecken (Abb. 7).

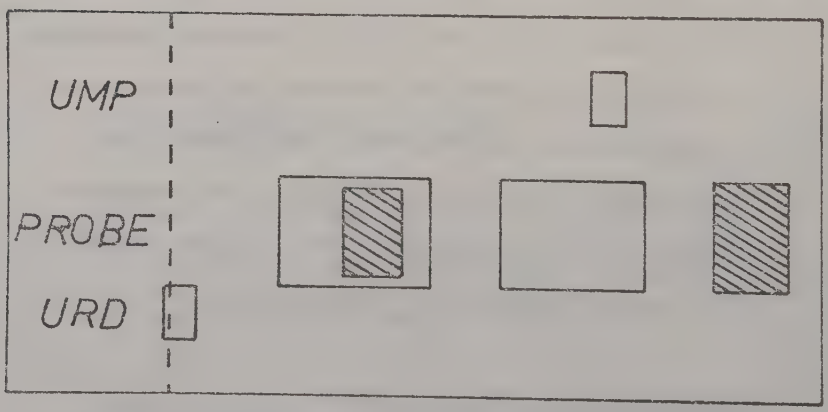


Abb. 7: Hochspannungspapierelektrophorese.
Näheres s. Text; schraffiert = fluoreszierende Substanzflecken.

c. Nucleosidanalysator.

Zum summarischen Nachweis der Ribosidanteile der Fraktion 28 genügt die kombinierte Anwendung von Schlangengiftdiesterase und alkalischer Phosphatase (s.a. Kap. V, e). Die heterogene Zusammensetzung, die wir nach den zuvor verwandten chromatographischen Verfahren vermuten konnten, bestätigte sich voll (Tab. 2).

PROBE	DU	URD	GUO	ADO	CYD
1	20,8	44,8	6,5	24,2	3,6
2	7,9	4,5	21,3	40,2	26,1
3	24,6	16,9	37,9	27,5	4,4

Tab. 2: Nachweis der Ribonucleosidanteile am Nucleosidanalysator nach GASSEN und LEIFER in prozentualen Anteilen der Gesamtextinktion bei E_{260}.
DU = Durchbruch;
URD = Uridin;
GUO = Guanosin;
ADO = Adenosin;
CYD = Cytidin.

Die alkalische Phosphatase spaltet nicht die 3',5'-Phosphatbrücken. Daher gelingt der Nachweis von Oligonucleotiden durch den Vergleich der Analyse nach Spaltung durch alkalische Phosphatase mit der Analyse

nach kombinierter Anwendung von alkalischer Phosphatase und Schlangengiftdiesterase. Während bei der Reaktion mit alkalischer Phosphatase allein die Oligonucleotide im Durchbruch erscheinen, erhöht sich die Ausbeute an Ribosiden unter gleichzeitiger Verringerung der Durchbruchextinktion bei Kombination der beiden Enzyme (s. Tab. 3 im nächsten Kapitel).

d. Rechromatographie an DEAE Sephadex A-25.

Ein vollständiges Bild über den tatsächlichen Gehalt verschiedener Nucleotide einer entsalzenen Probe von Fraktion 28 ließ sich erst durch Rechromatographie an DEAE Sephadex A-25 gewinnen. Durch die gegenüber DOWEX besseren Separationseigenschaften dieses Anionenaustauschers gelang die Auftrennung in 15 verschiedene Anteile (Abb. 8). Da wir nach den vorangegangenen Untersuchungen Oligonucleotide vermuten konnten, beschränkten wir uns darauf, sie in neun summativen Abschnitten durch enzymatische Spaltung zu untersuchen. Dabei wurde die 3',5' -Phosphatbrückenbindung der Oligonucleotide in zwei Analysengängen nachgewiesen; im ersten wurde eine alleinige Spaltung durch BAP durchgeführt, im zweiten wurde BAP und SGD kombiniert. Die Proben wurden jeweils am Nucleosidanalysator getrennt (Tab. 3).

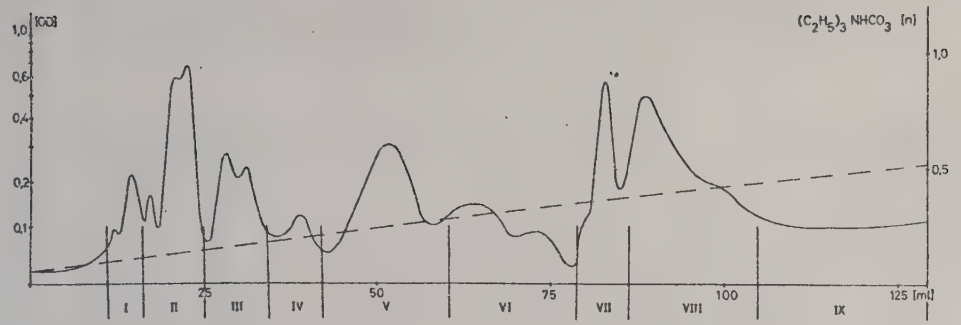


Abb. 8: Ionenaustausch-Chromatographie der Fraktion 28 an DEAE Sephadex A-25. Säule: 15 x 0,6 cm. Gradient: 100 ml 0,6 M $(C_2H_5)_3NHCO_3$; 100 ml 0,003 M $(C_2H_5)_3NHCO_3$. Durchlaufrate: 3,2 ml/h.

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
DU	a	*	1.65	1.40	0.44	1.22	0.29	0.33	1.36	1.27
	b		0.66	0.78	0.42	1.42	0.46	0.31	0.77	0.90
URD	a		1.81		0.18	0.05	0.17	0.04	2.97	0.86
	b		2.30	0.65	0.20	0.04	0.18	0.06	3.43	1.16
GUO	a		0.25	1.19	0.09	1.95	0.06	1.39	0.08	0.02
	b		0.84	1.15	0.11	2.35	0.06	1.36	0.31	0.30
ADO	a		0.40		0.63	0.46	0.86	0.04	0.27	
	b		1.12		0.65	0.39	0.68	0.06	0.07	
CYD	a		0.14						0.01	
	b		0.20						0.05	

Tab. 3: Ribosidanteile der IX Abschnitte der in Abb. 8 dargestellten Auftrennung der Fraktion 28.
a) Spaltung durch BAP allein, b) Spaltung durch Kombination von BAP und SGD;

* nicht bestimmbar wegen mangelhafter Entsalzung.

Abkürzungen wie in Tab. 2. - Werte in OD ≈ E_{260}-Einheiten.

Auch nach der kombinierten Spaltung verbleibt immer noch in allen Fraktionen ein relativ hoher Durchbruch, in welchem, wie bereits erwähnt, u.a. Thionucleoside enthalten sein dürften. Die Behandlung mit BAP allein zeigt das Vorhandensein von Mononucleotiden an, die wahrscheinlich bei der Aufarbeitung (Entsalzung) entstanden sind.

D. DISKUSSION

Die von uns untersuchte Fraktion war von KANIG (1965) der Reihe der säurelöslichen Nucleotide zugerechnet worden. Tatsächlich waren bei der Präparation mit o,5 n $HClO_4$ bei 0° C bisher nur Nucleotide im Ionenaustausch-Chromatogramm beschrieben worden (HURLBERT u. Mitarb. 1954; SCHMITZ, 196o). Die Isolierung eines Guanosinanteils und die dreieinhalbmal höhere Konzentration im Rattengehirn Neugeborener gegenüber fünfundzwanzig Tage alten Ratten schienen für eine Coenzymfunktion bei der Proteinsynthese zu sprechen, die im Neugeborenengehirn relativ hoch ist (Mc ILLWAIN, 1966). Nach mehreren Untersuchungen von HOAGLAND u. Mitarb. (1958 u.a.) sowie Berichten von REVEL u. Mitarb. (197o) ist diese Annahme wegen der GTP-Abhängigkeit des Initiationsvorganges und des Auftretens von GTP-Transferfaktoren-Komplexen nicht unberechtigt.

Das inkonstante Auftreten der Fraktion 28 in zwei Gipfeln und die Verschiebung des Quotienten E_{28o} / E_{26o} von o,8 nach o,7 war von KANIG (1965) durch die Anwesenheit eines - bisher nicht isolierten - zweiten Nucleotids erklärt worden. Da die Trennschärfe der DOWEX-Anionenaustauscher im Bereich der höher polaren Nucleotide (Nucleosidtriphosphate) und bei der Notwendigkeit, Eluentien größerer Ionenstärke anzuwenden, sehr stark abnimmt, war es früheren Untersuchern nicht möglich gewesen, die Vielzahl der Einzelanteile der Fraktion 28 sofort zu überblicken.

Durch die Verwendung weiterer eindimensionaler chromatographischer Verfahren (Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese) läßt sich dieser Mangel nur unvollständig kompensieren. Einmal wird durch die relativ geringen Unterschiede in Molekülgröße und Polarität eine auch nur annähernd vollständige Auftrennung aller Fraktionsanteile nicht erreicht. Darüber hinaus werden die wechselnden R_F-Werte leicht fehlinterpretiert, da eine Verfälschung der Pufferlösungen durch unvollständige Entsalzung der aufgetragenen Proben auftreten kann.

Während es schließlich durch die guten separativen Eigenschaften der DEAE-Cellulose Sephadex A-25 gelingt, nicht nur eine Entsalzung sondern auch eine nahezu vollständige Auftrennung der Fraktion 28 in eine hohe Zahl von Einzelanteilen zu gewinnen, so läßt die Spektrophotometrie der einzelnen Anteile doch wieder nur Mischspektren erkennen. Erst die Kombination von enzymatischer Spaltung mit der Untersuchung am Nucleosidanalysator führte zu einer Klärung der Bestandteile der Fraktion 28. Danach handelt es sich um sehr kurzkettige Oligoribonucleotide.

Ob es sich hierbei um Produkte des Nucleinsäure-Intermediärstoffwechsels handelt, können wir durch diese Untersuchungen nicht klären. Die Art der

Gewebeextraktion scheint eher für die Möglichkeit zu sprechen, daß es sich bei den Oligonucleotiden um RNA-Degradationsprodukte handelt. OGUR und ROSEN (1950) hatten die von KALCKAR (1947) eingeführte Form der perchlorsauren Extraktion zur Untersuchung verschiedener Gewebe auf deren Gehalt an Nucleinsäuren angewandt. Sie entfernten Nucleotide mit 0,2 n $HClO_4$ und gewannen RNA mit 1 n $HClO_4$ durch achtzehnstündige Extraktion bei 4° C. Sie bezogen dabei die Nucleinsäuren in ihren Extinktionen bei 260 und 280 nm auf den Phosphatgehalt. Von HESS und THALHEIMER (1964) wurde diese Methode modifiziert zur quantitativen Bestimmung des Nucleinsäuregehaltes verschiedener menschlicher Hirnareale. Dabei werden die Nucleotide mit 0,3 n $HClO_4$ entfernt und die RNA durch achtzehnstündige Extraktion mit 1,6 n $HClO_4$ bei 4° C gewonnen.

Die von HESS und THALHEIMER verwandte Methode zum quantitativen Erfassen der Nucleinsäuren verschiedener Gewebe liefert nur vergleichbare Ergebnisse, wenn die hierdurch gewonnenen Nucleinsäuren nach Struktur und Molekulargewicht denen nach anderer Methode extrahierten (z.B. mit Phenol) völlig entsprechen. Sollten dabei Nucleinsäurespaltprodukte entstehen, so ergeben sich höhere Extinktionen als bei intakten Nucleinsäuren (Hyperchromieeffekt; aus HARBERS, 1969). Papier- und gelchromatographische Untersuchungen der mit der Methode von HESS und THALHEIMER gewonnenen Extrakte durch PIERRE (1969) ergaben jedoch, daß hierbei lediglich Nucleinsäurespaltprodukte, Oligonucleotide, Riboside und Basen

entstehen. Die Spaltprodukte unterlagen dabei keiner Regel in Bezug auf Bruchstückgröße und Basenanteile. Sie entstanden nicht nur bei der Extraktion aus Rattenhirnen sondern auch bei der Behandlung fertigpräparierter Nucleinsäuren (Boehringer, Mannheim) mit 1,6 n $HClO_4$. Die geringen Abweichungen bei den Serienversuchen von HESS und THALHEIMER sind daher schwer zu erklären.

Wir können aus unseren Ergebnissen schließen, daß bereits durch o,5 n $HClO_4$ bei 0° C geringe Mengen RNA-Anteile gewonnen und zu Oligonucleotiden, Ribosiden und Basen gespalten werden. Während die daraus entstehenden Basen und Riboside in den Fraktionen A und B auftreten (s. Abb. 3), erscheinen die Oligonucleotide wegen ihrer höheren Polarität erst in der Fraktion 28.

Neben der übereinstimmend beschriebenen Beobachtung, daß DNA mit Perchlorsäure nur in der Wärme zu gewinnen ist, spricht das völlige Fehlen von Thymin und Desoxyribosiden im Analysatorchromatogramm gegen das Vorhandensein von DNA-Anteilen in der Fraktion 28.

Da bei der Extraktion mit o,5 n $HClO_4$ möglicherweise die kleinmolekularen RNA erfaßt werden, könnte es sich bei den Oligonucleotiden um tRNA-Bruchstücke handeln.

Der Nachweis fluoreszierender Substanzflecken im Papierchromatogramm und in der elektrophoretischen Auftrennung der Durchbrüche spricht für die Anwesenheit von Thionucleobasen, die seit der Entdeckung des natürlichen Thiouracils durch LIPSETT in zunehmender Zahl als seltene Basen der tRNA gefunden worden sind.

Wie läßt sich aber der Befund von KANIG (1965), der eine 3 1/2-mal höhere Konzentration der Fraktion 28 im Gehirn neugeborener Ratten gefunden hatte, mit der Annahme von tRNA-Bruchstücken erklären ? Es ist bekannt, daß während der Periode der Zellproliferation die Nucleinsäure-Konzentration (DNA und RNA) am größten ist (Mc ILWAIN, 1966). Da diese Periode bei der Ratte bis zur Geburt andauert, dürfte der Nucleinsäuregehalt des Neugeborenengehirns noch höher sein als der des Erwachsenengehirns. Untersuchungen von PALLADIN (1955) hatten auch beim Kaninchengehirn noch eine postnatale Abnahme der Nucleinsäure-Konzentration ergeben. Wenn es sich also bei der Fraktion 28 um Bruchstücke der tRNA handelt, müßte auch von diesem Aspekt her die Fraktion im Gehirn neugeborener Ratten höher konzentriert sein als im Gehirn erwachsener Ratten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Im Ionenaustausch-Chromatogramm säurelöslicher Rattenhirn-nucleotide an DOWEX 1X8 findet sich als letzte eine hochpolare Fraktion. Es wird versucht, die Bestandteile dieser hoch salzhaltigen Fraktion mit verschiedenen chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren zu analysieren.

Bei Rechromatographie an DEAE-Cellulose zeigt sich schließlich, daß die untersuchte Fraktion aus mindestens 15 Anteilen besteht. Durch enzymatische Spaltung mit bakterieller alkalischer Phosphatase und Schlangengiftdiesterase lassen sich Ribonucleoside freisetzen, die am Nucleosidanalysator nach GASSEN und LEIFER (1970) bestimmt werden. Danach handelt es sich bei den Bestandteilen der Fraktion in erster Linie um kurzkettige Oligonucleotide, die polarer als GTP sind. Der nicht am Nucleosidanalysator auftrennbare Teil enthält Thiobasen.

Da die Konzentrationen der Nucleobasen bei verschiedenen Versuchen nicht im gleichen Verhältnis auftreten, kann vermutet werden, daß bei der Extraktion mit 0,5 n Perchlorsäure bei 0° C bereits ein geringer, aber wechselnder Anteil der RNA miterfaßt wird. Dabei dürfte es sich

vor allem um kleinmolekulare RNA, z.B. tRNA, handeln, da man nach HESS und THALHEIMER (1965) mit 1,6 n Perchlorsäure bei 4° C längere Zeit extrahieren muß, um höhermolekulare RNA zu gewinnen. Die hochmolekulare DNA kann mit Perchlorsäure sogar erst in der Wärme extrahiert werden. Auch die Anwesenheit von Thiobasen spricht dafür, daß in erster Linie tRNA erfaßt wird.

Der Befund von KANIG (1965), daß die Fraktion in Gehirnextrakten neugeborener Ratten größer ist als in denen erwachsener Ratten, kann mit dem höheren Nucleinsäuregehalt des Neugeborenengehirns erklärt werden.

F. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
ADO (Ado)	Adenosin
BAP	bakterielle alkalische Phosphatase
cpm	counts per minute
CYD (Cyd)	Cytidin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DU	Durchbruch (der nicht an den Ionenaustauscher gebundene Teil einer Probe)
G	Guanin
GTP	Guanosin-5′-triphosphat
GUO (Guo)	Guanosin
IMP	Inosin-5′-monophosphat
mRNA	messenger RNA
OAc	Acetatrest
OD	Optical Density (1 OD: Materialmenge, die in 1 ml Lösung bei 1 cm Lichtweg bei bestimmter Wellenlänge die Extinktion von 1,0 ergibt)
$^{32}P_i$	mit ^{32}P radioaktiv markiertes anorganisches Phosphat
RNA	Ribonucleinsäure
SGD	Schlangengiftdiesterase
tRNA	transfer RNA
U	Uracil
URD (Urd)	Uridin

G. LITERATUR

ANDERSON, N.G.: Analytical techniques for cell fractions, II. A spectrophotometric Column Monitoring System. Anal. Biochem. 4, 269-283 (1962)

BRÜSTLE, J.-F.: Der Einfluß von Pyritinol auf die freien Nucleotide des Gehirns. Inaug.Diss.Med.Fak.d.Universität d. Saarlandes, Homburg/Saar, 1969

CARBON, J.A., L. HUNG, and D.S. JONES: A reversible oxidative inactivation of specific transfer RNA species. Proc.Natl. Acad.Sci. U.S. 53, 979-986 (1965)

COHN, W.E.: The separation of purine and pyrimidine bases and of Nucleotides by ion exchange. Science 109, 377-378 (1949)

COHN, W.E.: The anion-exchange separation of Ribonucleotides. J.Am.Chem.Soc. 72, 1471-1478 (1950)

COHN, W.E., and F.J. BOLLUM: Chromatography and desalting of nucleotides with ammonium bicarbonate on anion-exchange columns. Biochem.Biophys.Acta 48, 588-590 (1962)

CRAMER, F.: Papierchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1962

CRANE, R., and F. LIPMANN: The effect of arsenate on aerobic phosphorylation. J.Biol.Chem. 201, 235-243 (1953)

GASSEN, H.G.: Separation of Oligonucleotides derived from the Phenylalanine transfer-ribonucleic acid of escherichia coli B by Thin-Layer-techniques. J. Chromatog. 39, 147-156 (1969)

GASSEN, H.G., und W. LEIFER: Über einen Analysator in der Nucleinsäurechemie. Z.Anal. Chem. 252, 337-343 (1970)

HARBERS, E.: Nucleinsäuren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969

HESS, H.H., und C. THALHEIMER: Microassay of biochemical structure components in nervous tissues, I. J.Neurochem. 12, 191-204 (1965)

HOAGLAND, M.B., M.L. STEPHENSON, J.F. SCOTT, L.I. HECHT, and P.C. ZAMECNIK: A soluble ribonucleic intermediate in protein synthesis. J.Biol.Chem. 231, 241 - 257 (1958)

HURLBERT, R.B., H. SCHMITZ, A.F. BRUMM, and V.R. POTTER: Nucleotide metabolism, II. Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. J.Biol.Chem. 2o9, 23-39 (1954)

KALCKAR, H.M.: Differential Spectrophotometry of purine compounds by means of spezific enzymes, I. Determination of hydroxypurine compounds. J.Biol.Chem. 167, 429-443 (1947)

KANIG, K.: Der Einfluß zentral wirksamer Substanzen auf den Nucleotid-Stoffwechsel des Gehirns. Habil. Schrift, Med.Fak.d.Freien Universität Berlin 1963

KANIG, K.: Das Verhalten der freien Nucleotide des Rattenhirns von der Neugeborenenperiode bis zum Erwachsenenalter. Vortr. Neurochemical Conferance, Oxford 1965; in: ANSELL, G.B. (Ed.): Variation in chemical composition of the nervous system as determined by developmental and genetic factors. Pergamon Press, Oxford, 1966, p. 54

KANIG, K., und W. KORANSKY: Zur Identifizierung und Bestimmung der freien Nucleotide des Gehirns. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. u. Pharmak. 241, 484-5o6 (1961)

KANIG, K., und W. OESTERLE: Zum Nucleinsäure- und Nucleotid-Stoffwechsel des Gehirns. Med.Welt (N.F.) 1972, im Druck

KORNBERG, A.: Enzymatik synthesis of DNA. John Wiley, New York 1961

KORNBERG, A., und Mitarbeiter: 1958, zit. n. KORNBERG, A. 1961

LEHBERGER, F.-J.: Der Nucleotidgehalt des Rattengehirns nach Röntgenbestrahlung unter verschiedenen Bedingungen. Inaug.Diss. Med.Fak.d.Universität d.Saarlandes, Homburg/Saar 1971

LIEBIG, J.v.: Ann. 62 (1847), zit. n. SCHMITZ, H., 1961

LIPSETT, M.N.: The Isolation of 4-Thiouridylic Acid from the soluble Ribonucleic acid of E.Coli. J.Biol.Chem. 24o, 3975-3978 (1965)

MARKHAM, R., and J.D. SMITH: Chromatographic studies of nucleic acids. 4. The nucleid acid of the turnip yellow mosaic virus including a note on the nucleic acid of the tomato bushy stunt virus. Biochem.J. 49, 4o1-4o6 (1951)

McILWAIN, H.: Biocheminstry and the central nervous system.
Churchill, London 1966, pp. 273-287

OESTERLE, W.: Über den Stoffwechsel des 3-Acetylpyridin in vitro.
Inaug.Diss. Med.Fak.d.Freien Universität Berlin, Berlin 1966

OESTERLE, W., K. KANIG, W. BÜCHEL, and A.-K. NICKEL: Preparation of DNA and four different RNA species from rat brain. A new RNA fraction and a new characteristic of the various RNAs.
J.Neurochem. 17, 1403-1419 (1970)

OGUR, M., and G. ROSEN: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid.
Arch.Biochem. 25, 262-276 (1950)

PALLADIN, A.V.: Metabolism of nucleic acids in the brain during its development.
In: WAELSCH, H. (Ed.): Biochemistry of the developing nervous system.
Academic Press, New York 1955, p. 177-184

PIERRE, M.M.: Fraktionierte Perchlorsäure-Extraktion der Nucleinsäuren des Rattengehirns und ihre weitere Auftrennung durch Gelfiltration. Inaug.Diss. Med.Fak.d.Universität des Saarlandes Homburg/Saar, 1969

REVEL, N., H. GREENSHPAN, and M. HERZBERG: The function of initiator proteins in mRNA-Ribosome Interaction. In: OCHOA, S. et al. (Eds): Macromolecules/Biosynthesis and function. FEBS Symposium Vol 21, Academic Press, London and New York, 1970, p. 131-141.

RIBEIRO, L.P., E. MITIDIERI, and O.R. AFFONSO: Nucleic acids and their constituents. Elsevier, Amsterdam 1961

RUSHIZKY, G.W., and H.A. SOBER: Desalting of mono- and oligonucleotides. Biochem.Biophys.Acta, 55, 217 (1962)

SALSER, W., J. JANIN, and C. LEVINTHAL: Measurement of the unstable RNA in exponetielly growing cultures of bacillus subtilis and Escherichia coli. J.Mol. Biol. 31, 237-266 (1968)

SCHMITZ, H.: Vorkommen und Bedeutung von freien Nucleotiden in Zellen und Geweben. 11. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 28./30.April 1960 in Mosbach/Baden. Springer-Verlag, Heidelberg 1961, S. 1 - 25

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962

TSUBOI, K.K. and T.D. PRICE: Isolation, detection and measure of microgram quantities of labeled tissue nucleotides. Arch.Biochem.Biophys. 81, 223-237 (1959)

UZIEL, M.: Desalting of Nucleotides by gel filtration. In: COLOWICK, S.P. and O.KAPLAN (Eds.): Methods in Enzymology, Vol. XII, Nucleic acids, Part A, Academic Press, New York and London 1967, p. 407 - 414

UZIEL, M., and W.E. COHN: Desalting of nucleotides by gel filtration. Biochim. Biophys.Acta 103, 539-541, (1965)

UZIEL, M., C. KOH, and W.E. COHN: Rapid ion-exchange chromatographic mikroanalysis of uv-absorbing materials and its application to nucleosides. Anal. Biochem. 25, 77-98 (1968)

WEITZEL, G., und T. SPEHRM: Zink-Komplexe von Purinen, Nucleosiden und Nucleotiden. Hoppe-Seyler's Zschr.Physiol.Chem. 313, 212-226 (1958)

WIELAND, TH.,
G. PFLEIDERER:

Analytische und mikropräparative Trägerelektrophorese mit höheren Spannungen.
Angew. Chem. 67, 257-268 (1955)

Herrn Prof. Dr. Karl KANIG möchte ich für die Überlassung des Themas und die Einführung in das Gebiet der Nucleotid- und Nucleinsäurechemie danken. Fördernde Ratschläge, konstruktive Kritik und Ermutigung erhielt ich von Herrn Dr. Werner OESTERLE. Dafür danke ich ihm herzlich. Besondere Unterstützung erhielt ich von Herrn Dr. Hans Günter GASSEN und seinen Mitarbeitern am MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen. Durch die Benutzung seines Nucleosid-Analysators konnte ich die Fragestellung abschließend klären.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn RUBLY und den übrigen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie in der Universitäts-Nervenklinik Homburg/Saar danken, die mich bei vielen Fragen des Laboralltags unterstützt haben.

LEBENSLAUF

Am 1. Juni 1941 wurde ich in Ragnit/Ostpreußen als Sohn des Techn. Angestellten Werner Woischwill und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Forstreuter geboren. Nach der Volksschulzeit besuchte ich ab 1953 das Leibnizgymnasium in Wiesbaden. 1960 siedelten meine Eltern nach Mannheim um, wo ich meine Schulzeit 1963 am Tullagymnasium mit dem Abitur abschloß.

Nach einer zweijährigen Militärzeit immatrikulierte ich mich zum Sommersemester 1965 an der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg, wo ich nach 5 Semestern das Physikum ablegte. Ein Semester des klinischen Studiums absolvierte ich in Wien, 3 Semester in Homburg/Saar und 2 weitere in Heidelberg; hier beendete ich im November 1970 mein Studium mit dem Staatsexamen.

Die Medizinalassistentenzeit begann ich an der Universitäts-Nervenklinik Homburg/Saar in der Abteilung Neurochemie. Zur Zeit arbeite ich in der Inneren Abteilung der Diakonissenanstalt Flensburg.

Im August 1969 heiratete ich die Ärztin Claudia Meyer.